

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-154583

(43)Date of publication of application : 17.06.1997

(51)Int.Cl. C12N 15/09 C07H 21/04 C07K 16/44
C12N 1/21 C12P 21/02 G01N 33/53
G01N 33/531 A61K 39/395

(21)Application number : 07-316872

(71)Applicant : TANPAKU KOGAKU KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 05.12.1995

(72)Inventor : KIKUCHI MASAKAZU
HIROSE MIKA

(54) ANTIGLUTATHIONE ANTIBODY AND ITS PRODUCTION

Leu Tyr Arg Asn Lys Phe Lys Ser Arg Gly His
6 10 11

Thr Glu Tyr His His Val Arg Tyr Arg His Tyr Leu
5 13 12

Ala Trp Asp Val Arg Thr Glu Arg
8 6

Cys Trp Glu Asn Leu
5

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce a new antiglutathione antibody protein, available from a certain kind of a phage display library without immunizing an animal, capable of bonding to glutathione and a protein modified with the glutathione and useful for detecting or determining the glutathione.

SOLUTION: This new antibody protein is an immunologically active polypeptide, containing at least an amino acid sequence represented by formula I to IV In a CDR3 region or its derivative in which one or more amino acids are deficient, inserted or substituted or its active fragment and capable of bonding to glutathione or a protein modified with the glutathione. The protein is useful for detecting or determining the glutathione essential for controlling a redox state of a cytoplasmic reticulum and making a protein form a correct structure. The antibody is

obtained by finding a DNA capable of coding a polypeptide capable of specifically bonding to the glutathione from a certain kind of a phage display library without performing operations to immunize a mammal such as a mouse with an antigen and then expressing the resultant DNA.

対応なし、英抄

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-154583

(43) 公開日 平成9年(1997)6月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 16/44			C 0 7 K 16/44	
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 15 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-316872	(71) 出願人	000149974 株式会社蛋白工学研究所 大阪府吹田市古江台6丁目2番3号
(22) 出願日	平成7年(1995)12月5日	(72) 発明者	菊池 正和 大阪府豊能郡豊能町東ときわ台7-4-16
		(72) 発明者	▲廣▼瀬 未果 奈良県奈良市中山町西1-868-32
		(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外2名)

(54) 【発明の名称】 抗グルタチオン抗体及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 抗グルタチオン抗体を提供する。

【解決手段】 グルタチオン及びグルタチオンで修飾された蛋白質と結合することを特徴とする抗体蛋白質。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルタチオン及びグルタチオンで修飾された蛋白質と結合することを特徴とする抗体蛋白質。

【請求項2】 CDR3領域に、少なくとも配列番号1、2、3又は4に記載のアミノ酸配列を含有する、免疫学的に活性なポリペプチド又は1個以上のアミノ酸の欠失、挿入又は置換によるその誘導体又はその活性フラグメントである請求項1記載の抗体蛋白質。

【請求項3】 配列番号5、6、7又は8に記載のアミノ酸配列を含む免疫学的に活性なポリペプチド又は1個以上のアミノ酸の欠失、挿入又は置換によるその誘導体又はその活性フラグメントである請求項1記載の抗体蛋白質。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の抗体蛋白質をコードするDNA。

【請求項5】 配列番号1、2、3又は4に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する請求項4記載のDNA。

【請求項6】 請求項4又は5記載のDNAを含有する発現ベクター。

【請求項7】 請求項6記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項8】 請求項7記載の宿主細胞を培養し、培養物から免疫学的に活性な生成物を分離することを含む、抗グルタチオン抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、抗グルタチオン抗体及びその製造方法に関し、さらに詳しくは、グルタチオンと特異的に結合することができ、抗グルタチオン抗体活性を有する抗体蛋白質又はその活性なフラグメント、それをコードするDNA、該DNAを含有する発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された宿主細胞、並びにこれらを利用して抗グルタチオン抗体を製造する方法、及びこのようにして製造された、抗グルタチオン抗体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生体は外界からの異物に対して自己を守る防御機構をそなえている。その代表的なものが自己と異物とを厳密に識別する免疫である。この異物を認識するのは免疫グロブリンあるいは抗体と呼ばれる蛋白質であり、異物を抗原（非自己抗原）という。利根川らによって免疫グロブリンの遺伝子が解明された[Maki, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2138 - 2142 (1980)]ことによって、その構造遺伝子や抗原に対する多様性獲得の機構が遺伝子レベルで明らかにされた。図1に示すように、抗体蛋白質は2本の重鎖（H鎖）と2本の軽鎖（L鎖）からなる4量体によって形成されている。L鎖の約半分とH鎖の約3/4は、抗原の種類が変わってもそのアミノ酸配列はほとんど変わらないために

2

定常（C）領域と呼ばれ、L鎖、H鎖をそれぞれCL、CHと呼ぶ。また残りの部分は抗原の種類によってアミノ酸配列が変わるために可変（V）領域と呼ばれ、L鎖、H鎖をそれぞれVL、VHと呼ぶ。さらにV領域の中には、抗原によってアミノ酸配列が極めて変わり易い超可変領域（CDR, complementarity determining region）が3箇所あり、それぞれCDR1、CDR2、CDR3と呼ばれている。抗体の遺伝子はDNAの再配列によって抗体の多様性、すなわちそれぞれの異物を特異的に認識して結合する活性を産み出している。再配列後のB細胞から得られた抗体遺伝子では、L鎖遺伝子はV、J、Cの三つの遺伝子断片が、またH鎖遺伝子は、V、D、J、Cの四つの別々の遺伝子断片が寄せ集まって形成されている。すなわち、これらの遺伝子断片の連結のされ方が変化することによって、遺伝子がコードするアミノ酸配列に多様性が生じる。なお、Jは接合(joining)を、Dは多様性(diversity)を意味する。例えば、マウスのH鎖の遺伝子は約1000個のV断片、約20個のD断片、及び4個のJ断片と1個のC断片の組み合わせから形成されているが、その再配列、すなわち各断片からの遺伝子の選択とそれらの結合とによって多くの多様性を生じる。またCDR1とCDR2はV断片によってコードされ、CDR3はV断片の3'末端領域、D断片及びJ断片の5'末端領域によってコードされている。従って、CDRの中にあってCDR3のアミノ酸配列が一番変化に富んでいる。

【0003】通常、1種類の抗原によって複数のリンパ球クローンが刺激されるので、ほとんどの抗原に対する応答はポリクローナルである。その結果得られる免疫血清（ポリクローナル抗体という）は、抗原分子の詳細な機能解析や抗原分子の抗原決定基地図の作成などには利用できない。ところが、細胞融合技術が確立された[Kohler, G. & Milstein, C., Nature, 256, 495 - 497 (1975)]ことによって、抗原に対して特異性を持った単一の抗体（モノクローナル抗体という）を作出するハイブリドーマ技術が確立された。この技術はモノクローナル抗体を基礎研究や診断剤として使用する多くの実際面での応用例を生みだしてきた。その反面、抗原でマウスを免疫するという繁雑な操作が必要であると同時に、自己の持つ成分や低分子量の化合物に対しては、通常免疫応答が引き起こされないために、それらに対する抗体を得ることができないという問題点を有している。

【0004】

【発明が解決すべき課題】最近、自己成分の認識の機構に破綻をきたした自己免疫疾患の存在が数多く明らかにされてきた。このような自己成分の1つにグルタチオンがある。グルタチオンは低分子量であって、その血中や尿中の濃度が上昇するとグルタチオン血症（glutathionemia）などの疾患を引き起こす。また、癌細胞の耐性獲得にも関与していることが示唆されている。グルタチオンは主として小胞体に存在して小胞体の酸化還元状態を

コントロールしており、蛋白質が正しい構造を形成する上で必須の成分である。さらには蛋白質のジスルフィドと反応して、そのジスルフィド基を維持する機能や過酸化水素遊離反応基と反応して解毒する機能をも有する。従って、このようなグルタチオンあるいはグルタチオンで修飾された蛋白質を迅速に検出しかつ定量する手法が望まれている。そのためには抗体の利用が望ましいが、グルタチオンは自己成分であると同時に分子量が小さいため、これまでの技術では抗体を取得することは不可能であった。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、グルタチオンに対して特異的な結合活性を有する抗体を提供することを目的として鋭意、研究を重ね、ある種のファージディスプレイライブラリー(phage display library)から、グルタチオンと特異的に結合し得るポリペプチドをコードするDNAを得、該DNAを用いて目的の抗グルタチオン抗体活性を有するポリペプチドを製造することに成功した。即ち、本発明は、グルタチオン及びグルタチオンで修飾された蛋白質と結合することを特徴とする抗体蛋白質を提供するものである。本発明の抗体蛋白質は、グルタチオンに特異的に結合するものであればいかなるものであってもよいが、好ましくは、CDR3領域に、少なくとも配列番号1、2、3又は4に記載のアミノ酸配列を含有する、免疫学的に活性なポリペプチド又は1個以上のアミノ酸の欠失、挿入又は置換によるその誘導体又はその活性フラグメントであり、さらに好ましくは配列番号5、6、7又は8に記載のアミノ酸配列を含む免疫学的に活性なポリペプチド又は1個以上のアミノ酸の欠失、挿入又は置換によるその誘導体又はその活性フラグメントである。本発明はまた、抗グルタチオン抗体をコードするDNAを提供するものである。本発明のDNAは、少なくとも、配列番号1、2、3又は4に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有することが好ましい。本発明はまた、該DNAを含有する発現ベクターを提供するものである。さらに、本発明は該発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供するものである。本発明はまた、該宿主細胞を培養し、培養物から免疫学的に活性な生成物を分離することを含む、抗グルタチオン抗体の製造方法を提供するものである。

【0006】本明細書中、「免疫学的に活性なポリペプチド」及び「免疫学的に活性な生成物」なる語句は、それらがin vivoで惹起される抗グルタチオン抗体と同様にグルタチオンを認識し、特異的に結合する活性を有する物質であることを意味する。また、本明細書では、本発明の抗グルタチオン抗体を表すために、「蛋白質」及び「ポリペプチド」を相互変換可能に用いている。このように、本発明の抗体蛋白質若しくはポリペプチド、又はそのフラグメントは、免疫学的な意味において、抗グルタチオン抗体と同等であることから、それらを総合的に

「抗グルタチオン抗体」とも呼称する。本発明により、抗グルタチオン抗体をコードするDNAが開示されたので、それを用いて当該技術分野でそのDNAの合成もできるし、既知のアミノ酸の欠失、挿入及び置換の手法に従い、抗グルタチオン抗体活性を有する誘導体も得ることができる。従って、本発明はそのようにして得られる誘導体をも包含するものである。さらに、抗体は、抗原を認識し、結合する免疫学的な活性を保持している限り、適当な長さの断片であってもよい。従って、本発明は、そのような活性フラグメントをも包含するものである。断片化は、当業者既知の方法で行うことができる。

【0007】

【発明の実施の形態】以下に本発明の抗グルタチオン抗体の製造について説明する。本発明の抗体はファージディスプレイライブラリー(phage display library) [Winter, G. and Milstein, C., Nature, 349, 293 - 299 (1991)]の1種であり、Nissimらによって作成された公知のライブラリー [Nissim, A., et al., EMBOJ., 13, 692 - 698 (1994)]から選択された。このライブラリーは以下に記載の方法や文献に従って当業者が作製できる。ファージディスプレイライブラリーは、特に、自己及び/又は低分子量抗原に対する抗体の選択に好都合である。例えば、環状一重鎖DNAを持った大腸菌のファージ、例えばファージfdを利用した場合、その表面に発現しているコート蛋白質、例えばq3p (gene 3 protein) のN末端にペプチドや蛋白質をつないで、目的とするペプチドや蛋白質をファージの表面に発現させ、その機能を調べることができる。従って、大腸菌を用いてファージ表面に一重鎖のFvフラグメント (VHの下流にリンカーを介してVLをつないだもの、scFvともいう)、あるいはFabフラグメント (抗体のVL, CL1とVH, CH1からなるヘテロ二量体) (図2参照) を、表現させることができる [Hooqenboom, H. R. et al., Nucleic Acids Res., 19, 4133 - 4137 (1991)]。後者のように、重鎖部分をファージ表面に発現させた場合は、軽鎖部分を同時に分泌発現させ、大腸菌のペリプラズム内で両者を再構築してFabとすることができる。一方、抗体フラグメントとファージコート蛋白質との間にアンバー変異を入れておき、かつ宿主を使い分けることによって、フラグメントを可溶性蛋白質として回収することもできる。従って、in vivo [Marks, J. D. et al., J. Mol. Biol., 222, 581 - 597 (1991)]あるいはin vitro [Hooqenboom, H. R. & Winter, G., J. Mol. Biol., 227, 381 - 388 (1992)]で再配列させたV遺伝子を使ってより多彩な組合せを作れば、動物を免疫する方法によらず、同一ライブラリーから異なる結合能をもった抗体を単離できる。

【0008】このように、これらのライブラリーから外来抗原、自己抗原を含めているような抗体を選択することが可能である。なお、図2はq3pを介して抗体ペプチドをファージ表面で発現させた状態を示している。図

中、(a)はFabフラグメント(抗体のV_H, C_HとVH, CH1からなるヘテロ二量体)を、(c)は一重鎖のFvフラグメント(VHの下流にリンカーを介してV_Hをつないだもの)を、q3pを介してそれぞれファージ上で発現させた状態を示している。様々なVH及びVL遺伝子の組合せはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅されたリンパ球の数に由来しており、様々なフラグメントがランダムに対をなすことによって形成される。このようにして作成したライブラリーから、数回の選択を繰り返して目的とする物質に対する結合能を有するファージが選出される。即ち、既に公知の方法でヒトの末梢血リンパ球からmRNAを抽出して相補DNAを調製し、PCR法によって人工的に再配列させた抗体のV遺伝子を増幅してそのレパートリーを調製する。このH鎖及びL鎖のV領域を線状ファージの表面に表現させたライブラリーを構築し、この多様な組み合わせから目的とする抗体を取得できる。

【0009】既述のごとく、本発明の抗グルタチオン抗体は、公知のライブラリー[Nissim, A., et al., EMBO J., 13, 692-698 (1994)]から選択された。このライブラリーは、4から12残基からなるランダムなアミノ酸配列を導入できるようにデザインされたPCRプライマーを使って人工的なCDR3を造成し、その結果得られたCDR3領域をもつVH遺伝子[Hooenboom, H. R. & Winter, G., Nucleic Acids Res., 227, 381-388 (1992)]を含んでいる。このライブラリーは、in vitroで再配列された50のヒト生殖細胞VH遺伝子からなる種々の組合せのヒトVH遺伝子とL鎖としてヒトV_L3遺伝子とを組合せ、これらを前述した単鎖Fvフラグメント(sc Fv)としてファージ上に発現させたものである。50の生殖細胞VH断片の一つ一つはVHファミリーに基づくプライマーであるVHBACKSfiとHSLP4-HSLP12[Marks, J. D., et al., J. Mol. Biol., 222, 581-597 (1991)]を使って増幅することができる[Hooenboom, H. R. & Winter, G., Nucleic Acids Res., 227, 381-388 (1992)]。

【0010】ヒトのVH断片のCDR1、CDR2の配列多様性は、生殖細胞由来のおよそ50のVH断片の種類によって決められている[Tomlinson, I. M., et al., J. Mol. Biol., 227, 776-798 (1992)]。またCDR3の配列は生殖細胞由来のVH断片の配列、及びおよそ30個のD及び6個のJ断片の組み合わせで生成するので[Ichihara, Y., et al., EMBO J., 7, 4141-4150 (1988)]、極めて変化に富んでおり、かつアミノ酸残基の数も4-25残基と異なっている。従って、HSLPプライマーはJ断片と4から12個のアミノ酸からなるランダムな配列[(A/C, N, N)_n, (nは4-12, Nは塩基A, T, G, Cを示す)]を持つDNA断片を導入できるようにデザインされる。さらにプライマーの3'末端部分は、VH断片のFR3(CDR2とCDR3をコードする領域には含まれた遺伝子上の領域)にアニールできるようにデザインする。しかるに、HSLPの配列は5'-GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA[(A/C)nNN]TCT TGC ACA GT

A ATACAC GCC CGT GTCである。鋳型はそれぞれのVHセグメントをコードしている組換えM13ファージを感染させた10⁸の大腸菌として供給されている。

【0011】最初のPCRは、例えば94°Cで1分間処理して一本鎖にしたDNAに、VHBACKSfiとHSLPのプライマーを共存させて55°Cで1分間アニーリングする。続いて4種類のデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP)の共存下で72°Cで1.5分、DNAポリメラーゼと反応させる。この反応を25回繰り返してDNAを増幅する。2回目のPCRでは、JH断片の3'末端側にクローニングのために制限酵素切断部位、例えばSalIサイトを導入する。この場合には、プライマーとしてVHBACKSfi(既出)とJHSAL[Nissim, A., et al., EMBO J., 13, 692-698 (1994)]とを使って、さらに15回PCR反応を繰り返し、DNAを増幅する。ここで、JHSALの配列は、5'-GCC TGA ACC GCC TCC ACC AGT CCA CAC GGT GAC CAG GGT ACC TTG GCC CCA(配列番号9)であり、下線で示した部分がSalIサイトである。

【0012】450(50の生殖細胞由来のVH断片と4から12の9種の異なる長さを持つCDR3のPCR生成物の合計)の試料のバンドの大きさをアガロース電気泳動でチェックした後、制限酵素NcoIとSalIで処理して得た断片をpHEN1-V_L3[Hooenboom, H. R. & Winter, G., J. Mol. Biol., 227, 381-388 (1992)]のNcoI-XhoI切断部分と連結する。このベクターにはすでにV_L3をコードする遺伝子が組み込まれている(図3)。なお、図3のtagとして示される部分にc-mycペプチドの配列が入っている。得られる抗体は図2(c)で示されるsc Fvの型でファージ上に発現される。その結果、それぞれ少なくとも10⁷の異なるクローンを含む9種のファージミドライブラリーを構築できる。それぞれのライブラリーはヘルパーファージVCS-M13(Stratagene社)を使ってファージとして取り出すことができる。これらのライブラリーはファージミドを大腸菌に感染させて保存する。

【0013】ライブラリーの増殖には、およそ10⁸個の上述した組換え大腸菌を37°Cで、例えばアンピシリンを含む50mlの培地中で600nmにおける濁度(OD)が0.5になるまで振とう培養する。次にその10mlに例えばVCS-M13あるいはM13-K07(Stratagene社)などのヘルパーファージを、数として大腸菌の約20倍になるように加え、静置したまま37°Cで30分間培養する。次に、4000rpmで10分間遠心して菌体を集め、それをアンピシリンとカナマイシンを含む30mlの培地に懸濁した後、さらに培地を加えて300mlとし、30°Cで一夜振とう培養する。

【0014】pHEN1ファージミド粒子の調製にあたっては、上述した培養液を例えば8000rpmで10分間遠心した後、常法に従ってファージを集めればよい。すなわち得られた上清にその1/5量のポリエチレングリコール溶液(20%ポリエチレングリコール6000, 2.5M N

aCl)を加えてよく混合した後、4°Cで1時間放置する。4000rpmで30分間遠心して得られたペレットを40mlの水に懸濁後、8mlの上記のポリエチレングリコール溶液を加え、4°Cで20分放置する。この溶液を4000rpmで30分遠心して上清を除く。このようにして得られたペレットを2.5mlの水に懸濁し、さらに4000rpmで10分遠心して残った細胞破片を取り除いて4°Cで保存する。この方法で $1-5 \times 10^{11}$ PFUのファージが得られる。

【0015】抗グルタチオン抗体の選択のために、まずグルタチオンを、例えば牛血清アルブミン(BSA)に結合させる。方法はPierce社の手順書に従えばよい。すなわちスパーサーとしてSu1fo-SMCC[スルホスクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート]を用いてグルタチオンとBSAとを結合させる。まずpH7.0の緩衝液にBSAとその1/4量のSu1fo-SMCCを溶解し、30°Cで1.5時間振とうしながら反応させた後、例えばPD-10のようなゲル濾過カラムを通して結合物を得る。このようにして得られたマレイミド化されたBSA溶液にグルタチオンを加え、攪拌しながら室温で2時間反応させる。得られた溶液を例えばPD-10のようなゲル濾過カラムを通してグルタチオンとBSAとが結合したものを選り分ける。

【0016】次にこのようにして得られたグルタチオンと結合したBSAをチューブ(Nunc-immunotube, Nunc社)に加え、室温で一夜放置する。次の日にチューブをPBS(食塩を含むリン酸バッファー)で3回洗浄した後、例えばスキムミルクを含むPBSを用いてブロッキングし、さらにPBSで3回洗浄する。上記のチューブにスキムミルク入りPBSに 10^{12} から 10^{13} PFUの上記ファージを加え、室温で反応させる。チューブは0.1%のTween-20を含むPBSで20回、さらにはPBSで20回洗浄して界面活性剤を除去する。結合したファージは例えば100mMのトリエチルアミンを加えて10分間上下に回転して溶出する。溶出されたファージは即座に中和しなければならない。得られたファージは4°Cで保存する、このようにして得られたファージは例えば大腸菌TG1に感染させて、上記ライブラリーの増殖と同様の方法で増殖させることができる。

【0017】次に、増殖した大腸菌のコロニーをアンピシリンを含む100 μ lの培地を分注した96穴のプレートに移植し、振とうしながら37°Cで一夜増殖させる。次は200 μ lの同じ培地を含む96穴のプレートに各穴から少量移植して37°Cで1時間振とうして培養する。各穴に 10^8 PFUのVCS-M13を加えて37°Cで30分放置した後、37°Cで1時間振とうし、4000rpmで10分又は同様の条件下で遠心して上清を除く。ペレットをアンピシリンとカナマイシンとを含む200 μ lの培地に懸濁して30°Cで一夜振とう培養する。培養液を同様に遠心分離してその上清をファージELISAに使用する。

【0018】このようにして選んだファージを可溶性の

蛋白質として発現させる。まず 10^8 PFUのファージを大腸菌HB2151に37°Cで30分感染させる。これを希釈してアンピシリンを含む培地にまき37°Cで一夜培養する。生じたコロニーをアンピシリンを含む100 μ lの培地を分注した96穴のプレートに移植して37°Cで一夜振とう培養する。もう一度同じ培地を含む96穴のプレートに移植して、さらに37°Cで600nmにおけるODがおおよそ0.9になるまで振とう培養して増殖させる。ODが目的値に到達したら、IPTGを加えてさらに16から24時間振とうして遺伝子を誘発発現させる。4000rpmで10分遠心分離して、その100 μ lをELISAにかける。

【0019】単鎖FvのL鎖の後ろにはc-mycのペプチドが連結されているので、それを認識する抗体9E10[Clackson, T., et al., Nature, 352, 624-628(1991)]を使って発現した単鎖Fvを検出することができる。まず常法に従ってBSAに結合させたグルタチオンをプレートの穴にコーティングする。その96穴のプレートに上述した単鎖Fvを含む培養上清を加え吸着させた後、常法通り精製した9E10(9E10を生産するハイブリドーマはEuropean Collections of Animal Cell Culture, Centre for Applied Microbiology and Research (ECACC), Porton Down, Salisbury, SP4 0JK UKから受託番号85102202として入手できる)を加えて反応させる。次にパオキシダーゼを結合させた抗マウス抗体(DakopatsあるいはICN Biomedicals Inc. UKから入手できる)を加えて9E10に結合させて、次に洗浄する。これにABTS[2,2'-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt]と過酸化水素水を加えて20-30分放置した後、フッ化ナトリウムを加えて405nmでの吸収を読み、単鎖Fvの量を定量する[Nissin, A., et al., EMBO J., 13, 692-698(1994)]。大量の蛋白質を必要とする時は、通常の組み換え体の培養方法に従えばよい。また培養液から単鎖Fvを精製するには、例えば上清を限外ろ過などの方法で濃縮する。次にグルタチオン-S-トランスフェラーゼを精製するのに用いるグルタチオン-S-セファロース4Bカラムを用いて抗グルタチオン抗体を精製できる。またモノクローナル抗体9E10を用いても精製が可能である。その他単鎖Fvの精製に利用できる技術はいずれも抗グルタチオン抗体の精製に有効である。また遺伝子を取り出して目的とするベクターにつなげば、大腸菌に限らず酵母、枯草菌、糸状菌、昆虫細胞、動物細胞や植物細胞など、好みに従って単鎖Fvの発現に利用できる。このようにして得られた抗グルタチオン抗体は、目的通りグルタチオンの検出や定量に有用なことが判った。

【0020】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。なお以下の実施例は単なる例示に過ぎず、いかなる意味においても、本発明を制限するものではない。

実施例1 ライブラリーの培養

本発明の抗グルタチオン抗体の製造には、公知のNissimらのライブラリー[Nissim, A., et al., EMBO J., 13, 692 - 698 (1994)]を用いた。ライブラリー $50\mu\text{l}$ (約 10^8 cells) を $100\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン (明治製薬) 及び 1% のグルコースを含む 50ml の2 x TY (1 l中に16gのトリプトン、10gの酵母エキス、5gのNaClを含む) を入れた300mlのはね付きマイヤーに加え、攪拌しながら、 37°C で培養した。波長600nmの吸光度が0.5に達したとき、培養液10mlを取り、ヘルパーファージVCS-M13 (Stratagene) を大腸菌TG1株とヘルパーファージの数が1:20になるように加えた。

【0021】一方、残りの40mlは遠心して、沈殿を約0.5mlの2 x TYに懸濁した後、 100mg/ml のアンピシリン及び 1% のグルコースを含むTYE (1 l中に10gのトリプトン、5gの酵母エキス、8gのNaCl、15gのバクタアガーを含む) プレートにまき、 37°C で一晩培養して、そのすべてを適量の2 x TY (2~5ml) に懸濁し、最終濃度が20%になるようにグリセロールを加えて -80°C 凍結保存用とした。ヘルパーファージを加えた培養液は 37°C の水浴中で30分間培養した後、 2500rpm で15分間遠心分離して上清を除いた。沈殿を $100\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンと $25\mu\text{g/ml}$ のカナマイシン (和光純薬) を含む30mlの2 x TYに懸濁し、あらかじめ 30°C に保温した $100\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンと $25\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含む270mlの2 x TYに加えた後、攪拌しながら 30°C で一晩培養した。

【0022】実施例2 ファージの調製

実施例1に従って、一晩培養した液を 8000rpm で10分間遠心分離して沈殿を除去した後、培養上清にPEG/NaCl溶液 (20%のポリエチレングリコール6000と2.5MのNaClを含む) を1/5容量加え、よく攪拌した後 4°C で1時間放置した。その後、 8000rpm で30分間 4°C で遠心分離して、上清を取り除き、沈殿を40mlの滅菌水に懸濁して、8mlの上記のPEG/NaCl溶液を加えた後、攪拌し 4°C で20分間静置した。 4000rpm で30分間遠心分離して、上清をデカンテーションで取り除いた後、PEG/NaCl溶液を完全に取り除くために、再度、 4000rpm で10分間遠心分離して、上清をアスピレーターで取り除いた。その後、沈殿を2.5mlの滅菌水に懸濁して、 4000rpm で10分間遠心分離した後、上清を新しいチューブに移し、ファージ溶液を得た。このファージ溶液は*Escherichia coli* TG1株を宿主としてファージのtiterを測ったところ、 1×10^{13} PFUであった。

【0023】実施例3 グルタチオンとキャリアタンパク質との連結

[スルホスクシニミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (sulfo-succinimidy] 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate]; 以下、sulfo-SMCCと略す] 1.5mg を 1ml の 100mM リン酸ナトリウム緩衝液、 0.9M NaCl、 0.1M EDTAを含むpH7.

00のコンジュグート用緩衝液 (以下conjugation buffer という) に溶解させ、キャリアタンパク質として牛血清アルブミン (以下BSAと略す) (Sigma) もしくは Keyhole limpet hemocyanin (以下KLHと略す) (CALBIOCHEM) 4mg を加え 30°C で2時間攪拌した後、conjugation buffer で平衡化したPD-10カラム (Pharmacia) にかけて、 1ml ずつ分取した。波長 280nmで各フラクションの吸光度を測定し、一番初めに現われたピークの前4本を集めた。次に、グルタチオン 4mg をconjugation buffer 0.5ml に加え、その中から、 $50\mu\text{l}$ を取っておき、残りをsulfo-SMCCとキャリアタンパク質をコンジュグートした溶液に加えた。 4°C で一晩もしくは室温で2時間反応させた後、 100mM リン酸ナトリウム、 0.9M NaClを含むpH7.00の精製用緩衝液 (以下purification buffer という) で平衡化したPD-10ゲル濾過カラムにかけ、 0.5ml ずつ分取し、波長 280nmにおける吸光度を測定して、一番大きいピークを集めた。なお、コンジュグートした蛋白質中のグルタチオン濃度は、Ellman's反応にて測定した (Ellman, G. L. Arch. Biochem. Biophys. 94, 75-81(1958))。BSA-グルタチオン溶液は、グルタチオンの濃度が約 $50\mu\text{g/ml}$ になるように1 l中に5.84gのNaCl、4.72gの Na_2HPO_4 、2.64gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含むpH7.2に調製した緩衝液 (以下PBSと略す) で希釈してバニングのコーティング用として、また $10\mu\text{g/ml}$ もしくは $1\mu\text{g/ml}$ になるように同様にPBSで希釈してELISAのコーティングに用いた。

【0024】実施例4 抗グルタチオン抗体をディスプレイするファージの選択

約 $50\mu\text{g/ml}$ のBSA-グルタチオンを含むPBS溶液を高蛋白結合能を持つチューブ (Nunc) もしくはマイクロタイタープレート (Coastar) に 2ml もしくは $200\mu\text{l}$ ずつ加え、室温で一晩放置した。次の日、グルタチオン溶液を除いた後、PBSを噴射びんで注ぎ、デカンテーションで洗液を除く方法で3回洗浄した。次に、2%のスキムミルクを含むPBS (以下2%MPBSと略す) をふちまでいっぱいにつまみ、ふたをして 37°C で2時間放置した後、PBSで3回洗浄した。これに実施例2で調製した 10^{12} PFUのファージを含む2%MPBS溶液を加え、室温で2時間放置した。その後、0.1% Tween-20を含むPBSで15回洗浄し、次に、PBSで15回洗浄した。ファージ溶液を溶出するために 100mM のトリエチルアミンを、チューブの場合には 1ml 、プレートの場合には $100\mu\text{l}$ ずつ加え10分間放置した。10分間経過した後、溶出されたファージ溶液を先に用意したトリエチルアミンの半分量の 1M Tris-HCl、pH 7.4の入ったチューブに加え、直ちに中和した。

【0025】次に、あらかじめ波長600nmの吸光度が0.5になる迄培養した大腸菌TG1株9mlにファージ液1mlを加え、 37°C で30分間培養した。その後、 10^6 から 10^7 までの希釈系列をそれぞれ $200\mu\text{l}$ ずつ調製し、そのうちの $100\mu\text{l}$ ずつを $100\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン 及び 1% のグル

コースを含むTYEプレートにプレーティングした。また、残りの培養液は、2500rpmで20分間遠心分離した後、沈殿を1mlの2 x TYに懸濁し、100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含むTYEのプレートにプレーティングした。得られた大腸菌は抗グルタチオン抗体をディスプレイするファージを含むものとして、すべてのプレートを37°Cで一晩培養した。

【0026】**実施例5** アフィニティークロマトグラフィーによる抗グルタチオン抗体をディスプレイするファージの選択

まず、Glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia) をPBSで膨潤し、1mlの担体としカラムにつめPBSで洗浄した。10mlの2%MPBSでブロッキングした後、実施例2で得た 10^8 PFUのファージを含む2%MPBS溶液をこのカラムにかけた。その後、10mlのPBS、10mlの2%MPBS、10mlの0.5MNaCl-50mMTris-HCl、pH7.5、10mlの0.5MNaCl-50mMTris-HCl、pH8.5、10mlの0.5MNaCl-50mMTris-HCl、pH9.5で順にカラムを洗浄した後、5mlの100mMトリエチルアミンを用いてファージを溶出した。その際、溶出されたファージをすぐに中和するために、実施例4と同様にして溶出液を採取するチューブに前もって、2.5mlの1.0M Tris-HCl、pH7.4を加えておいた。このファージ溶液を2ml取って前もって600nmに於ける吸光度が0.5になるように培養しておいた大腸菌宿主TG1の培養液10mlに加えた。37°Cで30分間培養した後、100 μ lを取って100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含むTYEプレートにまき、次の日、プレートに出てきたコロニー数を数えた。また、残りの培養液は、遠心して菌体を沈殿させた後、200 μ lの2 x TYで懸濁し100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含むTYEプレートにまいた。選択されたコロニーは、実施例6のELISAに供した。

【0027】**実施例6** ELISAによる抗グルタチオン抗体をディスプレイするファージの検出

実施例4または5で選択した抗グルタチオン抗体をディスプレイするファージによって生じたコロニー570個を、100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含む100 μ lの2 x TYの入った96ウェルのマイクロタイタープレート (Corning) に接種し、攪拌しながら37°Cで一晩培養した。次の日、培養液の30 μ lを取って100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含む200 μ lの2 x TYの入った96ウェルのマイクロタイタープレートに移し、攪拌しながら37°Cで1時間培養した。その後、各ウェルに 10^8 PFUのVCS-M13ヘルパーファージと100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含む25 μ lの2 x TYを加えて、37°Cで30分間静置し、さらに1時間攪拌した後、2000rpmで30分間遠心分離して、上清を除去した。沈殿を100 μ g/ml のアンピシリン 及び 50 μ g/ml のカナマイシンを含む200 μ lの2 x TYに懸濁し、攪拌しながら30°Cで一晩培養した後、2000rpmで30

分間遠心分離して、この上清をファージ液として以下のELISAに用いた。

【0028】96ウェルのマイクロタイタープレート (Costar) に10 μ g/mlのBSA-グルタチオンを50 μ lずつ加え、室温で一晩静置した後、PBSで1回プレートを洗ってから、200 μ lの2%MPBSを各ウェルに加え、室温で2時間放置し、ブロッキングした。その後、各ウェルにすでに調製したファージ溶液を50 μ lずつ加え、2時間室温で放置した後、0.05% Tween20を含むPBSで1回、PBSで2回洗浄した。このウェルにホースラディッシュパーオキシダーゼ (以下HRPと略す) コンジュゲート抗M13ファージ抗体 (Pharmacia) を50 μ lずつ加え、室温で1時間放置した。その間に、2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン)-6 スルホン酸 ジアンモニウム塩 (2,2'-Azino bis (3-ethylbenzothiazoline)-6 sulfonic acid diammonium salt; 以下ABTSと略す) 10mgを20mlの50mMのクエン酸、pH4.5に加え、発色液とした。プレートを0.05% Tween20を含むPBSで2回、PBSで2回洗った後、上記の発色液に36 μ lの H_2O_2 を加え、よく混ぜた後、各ウェルに50 μ lずつ加えた。20~60分室温で放置した後、マイクロプレートイムリーダーを用いて、波長405nmの吸光度の値を測定し、グルタチオン-キャリアー蛋白質に対する結合能を調べた。その結果、570コロニー中、波長405nmの吸光度の値が0.5以上のものが24コロニー、0.1~0.5までのものが57コロニー得られた。これらのコロニーをKLH-グルタチオンを抗原としたELISAを行なったところ、すべてのコロニーで結合活性が認められた。また、BSAを抗原としてELISAを行なったところ、42個のクローンで結合活性が認められなかった。この結果に基づいて、グルタチオン-キャリアー蛋白質に特異的に結合する抗体をディスプレイするファージとしてこれらの42個のクローンを選択した。

【0029】**実施例7** 抗グルタチオン抗体単鎖Fv (sc Fv)フラグメントの検出

1) 抗体sc Fvフラグメントの調製

これまで述べた過程で、グルタチオンとの結合能を持つことが確認されたクローンを、抗体フラグメントとして働くことができるかどうかを調べた。調製されたファージを一部とって、大腸菌宿主HB2151に接種した。37°Cで30分間水浴中で培養した後、100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含むTYEプレートにまいて、一晩37°Cで培養して生じたコロニーをプレートからとって100 μ g/ml のアンピシリン 及び 1% のグルコースを含む2.5mlの2 x TYに移し、攪拌しながら一晩37°Cで培養した。次の日、培養液50 μ lをとって100 μ g/ml のアンピシリン 及び 0.1% のグルコースを含む30mlの2 x TYを入れた200mlのマイヤーに加え、37°Cで培養し、波長600nmの吸光度の値が0.9になったら、最終濃度が1mMになるようにイソプロピルチオ- β -D-ガラクトシド (Isopropylthio- β -D-galactoside; 以下IPTGと略す) を加

え、攪拌しながら30°Cで16~24時間培養した。その後、遠心分離して菌体を除去し、上清を濾過して別の容器に移し、10倍程度に濃縮して抗体フラグメント溶液とした。残りの培養液の一部は、等量の80%グリセロールを加えて、-80°Cで保存した。

【0030】2) 抗 c-myc 抗体 の調製

本発明の抗体は、図3にtagとして示すように、c-myc ペプチドは抗体のC末端に結合した形で発現されるので、該ペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。そこで、抗体scFvフラグメントの検出に必要な抗 c-myc モノクローナル抗体をハイブリドーマを用いて調製した。まず、抗 c-myc 抗体を産生するハイブリドーマMyc1 9E10 (ECACCより85102202として入手可能)を10%のウシ胎児血清(以下FCSという)を含むRPMI 1640培地(Gibco)10mlで一晩37°C、5%CO₂で培養した。次の日、細胞数を数え、10⁵/mlになるように希釈した後、一晩37°C、5%CO₂で培養した。5日間、細胞数のカウントと希釈を繰り返した後、細胞を十分に増やすため1週間37°C、5%CO₂で培養した。次に、培養液を濾過し、上清をFPLCシステム(Pharmacia製)を用いて50mM クエン酸が12.8%、100mMリン酸水素二ナトリウムが87.2%の緩衝液で平衡化したsuper protein Gカラム(Pharmacia製)にかけた。同じ緩衝液で洗浄した後、50mM クエン酸が89.2%、100mM リン酸水素二ナトリウムが10.8%の緩衝液で溶出し、溶出液を中和するために、1mlあたり150μlの1.0M Tris-HCl緩衝液を加えた。その後、この溶出液を50mM クエン酸が12.8%、100mM リン酸水素二ナトリウムが87.2%の緩衝液で平衡化したprotein Gカラム(Pharmacia製)にかけ、洗浄後、50mM クエン酸が89.2%、100mM リン酸水素二ナトリウムが10.8%の緩衝液で溶出した。1mlあたり150μlの1.0M Tris-HCl緩衝液を加えて中和した後、PBSにバッファー交換して2mg/mlに調製して抗体溶液とした。

【0031】3) 抗体scFv フラグメントのELISAによる検出

実施例6のファージ溶液を用いたELISAによる検出の場合と同様に、BSA-グルタチオンを用いたコーティング及びブロッキングを行なった。その後、各ウェルに2%のスキムミルクを含む50μlの抗体フラグメント溶液を加えた。2時間室温で放置した後、ウェルを0.05%Tween 20を含むPBSで1回、PBSで2回洗い、上記2)で調製した4μg/mlの9E10 抗体(抗マウス c-myc 抗体)を50μlずつ加え、90分間室温で放置した。ウェルを0.05%Tween 20を含むPBSで2回、PBSで2回洗い、次にHRP コンジュゲート抗マウス抗体(Sigma)を50μlずつ加え、90分間室温で放置した。その間に、10mgのABTSを20mlの50mM クエン酸、pH4.5に溶解し、ABTS溶液を調製した。0.05% Tween20を含むPBSで2回、PBSで2回ウェルを洗った後、上記のABTS溶液に36μlのH₂O₂を加えた溶液を各ウェルに50μlずつ加えた。20~60分間室温で放置した後、波

長405nmの吸光度の値を測定し、抗体フラグメントのBSA-グルタチオンとの結合能を測定して以下の結果を得た。

【0032】95個のクローンについて測定を行なったところ、波長405nmの吸光度の値が0.5以上のものが10コロニー、0.2から0.5までのものが19コロニー得られた。また、これらの29個のコロニーについてBSAを抗原としてELISAを行なったところ、BSAに対する結合活性がほとんど認められなかったものが14コロニー、少し活性があったものが11コロニー、波長405nmの吸光度の値が0.1以上あったものが4コロニー得られた。そこで、BSAに対する結合活性がほとんど認められなかったものと少し活性が認められたものをBSA-グルタチオンに特異的に結合する抗体として選択した。

【0033】実施例8 イムノブロットングによる抗グルタチオン抗体の検出

1) ドットブロットングによる検出

実施例6のELISAによって結合活性が認められたクローンについて、結合特異性を調べるためにドットブロットングを行った。適当な大きさのPVDF膜(Milipore)をメタノールとPBSで洗った後、BSA-グルタチオン、KLH-グルタチオン、BSAを1ドットにつき、約2μgずつPVDF膜に結合させて、10%MPBSで室温で1時間ブロッキングを行なった。0.2%Tween20を含むPBSでメンブレンを5分間、2回洗浄し、0.2%Tween20と2%スキムミルクを含む、実施例6で得たファージ溶液(10¹¹PFU/ml)1mlを、メンブレンを入れたハイブリバッグに加えた。4°Cで一晩振盪した後、0.2%Tween20を含むPBSで5分、2回洗い、0.2%Tween20を含む2%MPBSで5000倍に希釈したHRPとコンジュゲートしたヒツジ抗M13抗体(Pharmacia)を1ml加え、室温で2時間振盪した。その後、0.2%Tween 20を含むPBSで5分、2回、PBSで5分、2回洗い、ジアミノベンチジン溶液(0.5mg/ml)30mlを染色用容器に移し、使用直前にH₂O₂を10ml加え、メンブレンを入れた。室温で約15分 から30分程度(染色の度合いによって変える)振盪した後、メンブレンを蒸留水に移し反応を止めた。蒸留水でよく洗った後、風乾してドットを観察したところ、6D5、11C12、11D10、11F12、17B8、17H8、18B10及び18C2のクローンは、BSAに対する結合活性は見られなかったが、BSA-グルタチオン及びKLH-グルタチオンへの結合活性が認められた。従って、これらのクローンがグルタチオンを認識すること、及びグルタチオンで修飾された蛋白質の検出に有効であることが明らかになった。

【0034】2) ウェスタンブロットングによる検出

上記1)のELISAによって結合活性が見られた18B10、18C2のクローンについて、さらに結合活性について調べるためにウェスタンブロットングを行った。BSA-グルタチオンを1ウェルにつき約5μgのせ、Laemmliの方

法(Laemmli, U., Nature, 227, 680-685(1970))に従い、10%のSDSポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行なった。その後、HyBond-ECL膜(Amersham)にセミドライ法によって電圧7V、90分のエレクトロブロッティングを行ない、10%MPBSで室温で2時間ブロッキングを行ない、0.2%Tween20を含むPBSでメンブレンを5分、2回洗い、0.2%Tween20及び2%スキムミルクを含む実施例6で得たファージ溶液(10^8 PFU/ml) 1mlをメンブレンを入れたハイブリバッグに加えた。4°Cで一晩振盪した後、メンブレンを0.2%Tween20を含むPBSで5分、2回洗った後、HRPとコンジュゲートしたヒツジ抗M13抗体を0.2%Tween20を含む2%MPBSで5000倍希釈して加え、室温で2時間振盪した。その後、0.2%Tween20を含むPBSで15分、2回、PBSで5分、2回洗い、余分な水分を除去した後、化学発光によりハイブリダイズした抗体の検出が可能であるECL kit (Amersham)の1液と2液を等量加え、1分間緩く振盪した。その後サランラップで覆い、オートラジオグラフィーしたところ、18B10及び18C2においてBSA-グルタチオンへの結合活性が認められた。

【0035】実施例9 抗グルタチオン抗体をディスプレイしたファージのグルタチオンによる競合阻害実施例6で抗グルタチオン抗体をディスプレイすることが確認されたクローンについて、キャリアタンパク質とコンジュゲートしたグルタチオンのみでなく、グルタチオンそのものに対する結合活性があるかどうかを調べるために還元型グルタチオンを用いたELISA法による競合阻害実験を行った。実施例6及び8で確認された抗グルタチオン抗体をディスプレイする11F12、18B10、18C2及び6D5の各クローンについて競合阻害実験を行った。還元型グルタチオンをPBSに溶解し、 $1 \sim 10^{-5}$ mg/mlまでの希釈系列を100 μ lずつ調製した。96ウェルのマイクロタイタープレートに必要なウェルの分だけ10 μ g/mlのBSA-グルタチオンを50 μ lずつ加え、室温で一晩静置した後、PBSで1回プレートを洗ってから、200 μ lの2%MPBSを各ウェルに加え、室温で2時間放置し、ブロッキングした。その後、各ウェルに4%MPBSを25 μ lずつ加えた。続いて、各ウェル当たり 10^8 PFU/50 μ lを含むように調製したファージ溶液20 μ lと、調製した還元型グルタチオン5 μ lを含むように調製したPBS溶液を25 μ lずつ加えた。また、ポジティブコントロールとして、グルタチオンを加えないウェルにはPBSを5 μ lずつ加えた。

【0036】3時間室温で放置した後、0.05%Tween20を含むPBSで1回、PBSで2回洗浄した。このウェルにHRPコンジュゲート抗M13ファージ抗体(Pharmacia)を50 μ lずつ加え、室温で1時間放置した。その間に、ABTS 10mgを20mlの50mMのクエン酸、pH4.5に加え、発色液とした。プレートを0.05%Tween20を含むPBSで2回、PBSで2回洗った後、上記の発色液に36 μ lの H_2O_2 を加え、よく混ぜた後、各ウェルに50 μ lずつ加えた。20~60分室温で放

*置した後、マイクロプレートイムリーダーを用いて、波長405nmの吸光度の値を測定し、グルタチオン-キャリアー蛋白質に対する結合能を調べた。クローン11F12、18B10、18C2及び6D5による競合阻害実験の結果を、それぞれ、図4~7に示す。図中、縦軸は波長405nmの吸光度、横軸は還元型グルタチオンの量を表す。これらの図から明らかなように、11F12、18B10、18C2及び6D5のそれぞれのクローンのグルタチオンとの結合活性は、還元型グルタチオンを加えると、グルタチオンの量に依存して減少しており、これは、本発明のクローンが抗グルタチオン抗体であることを示すものである。

【0037】実施例10 抗グルタチオン抗体の塩基配列の決定

ELISAで活性が認められたクローンの内、11F12、18B10、18C2及び6D5について塩基配列を決定し、CDR領域と生殖系列(germ line)を調べた。塩基配列決定は、Sangerらの方法(Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74巻, 5463頁-5467頁)に従い、ABIの373A DNA シーケンサーを使用し、蛍光色素が結合したダイデオキシNTPによるターミネーター法で塩基配列を決定できるPRISM ready terminator kit を用いて行なった。ウェスタンブロッティングなどのために、大量に調製したファージの中から、一部をとって、単鎖(ss)のファージDNAを調製し、テンプレートとした。プライマーには、CDR3領域の直後の18merの配列(CAGGTACCTTGGCCCCA: 配列番号10)と軽鎖の可変領域のなかの18merの配列(GGCCACAGACACAGCAG: 配列番号11)を用いた。テンプレートがssDNAなので、0.8 μ molのプライマー(二重鎖(ds)DNAの場合には、3.2 μ mol)を用いた。プライマーとテンプレート及びプレミックス(ABI社)をSangerらの方法に従って、混合し、95°Cで30sec., 50°Cで15sec., 60°Cで4min., サイクルシーケンス反応を行なった。サイクルシーケンス反応が終了した後、プロトコールに従って、CTAB沈殿法を用いて、DNAの精製を行なった。

【0038】まず2.5mlの5% CTAB-0.5M NaCl を加え、軽く攪拌した後、10,000rpmで5分間遠心分離して得た沈殿を1.2M NaCl 50mlに懸濁した後、125mlの100% エタノールを加え、激しく攪拌し、10,000rpmで5分間遠心して上清を取り除いた。その後、沈殿を風乾してサンプルバッファー(脱イオン化ホルムアミド+EDTA+ブルーデキストラン) 4mlを加え、サンプル溶液とした。サンプル溶液をDNAシーケンサーにかけ、塩基配列を決定した。これらクローンの特徴は以下の表に示す通りである。

【0039】

【表1】

クローン	VH family	CDR3(アミノ酸配列)
------	-----------	--------------

17

6D5 VH1; DP-25
 11F12 VH1; DP-25
 18B10 VH3; DP-47
 18C2 VH3; DP-45

18

QWEDL (配列番号4)
 LTRNKFKSRGH (配列番号1)
 TQYHIMRYRIYL (配列番号2)
 AWDVTER (配列番号3)

クローン11F12をコードする塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号5に示す。配列番号5において、アミノ酸番号31-35はCDR1領域、アミノ酸番号50-66はCDR2領域、アミノ酸番号99-109はCDR3領域に相当する。また、クローン18B10をコードする塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号6に示す。配列番号6において、アミノ酸番号31-35はCDR1領域、アミノ酸番号50-66はCDR2領域、アミノ酸番号99-110はCDR3領域に相当する。クローン18C2をコードする塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号7に示す。配列番号7において、アミノ酸番号31-35はCDR1領域、アミノ酸番号50-65はCDR2領域、アミノ酸番号98-105はCDR3領域に相当する。但し、18C2のCDR3領域のアミノ酸のうち、No.104グルタミン酸は、アンバーコドンである。クローン6D5をコードする塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号8に示す。配列番号8において、アミノ酸番号31-35はCDR1領域、アミノ酸番号50-66はCDR2領域、アミノ酸番号99-103はCDR3領域に相当する。また、ELISAで活性のあった他のクローン(11C12、11D10、17B8、17H8、18B10)についてもシーケンスを行なったが、上記の4つのクローンのいずれかと同じ塩基配列を持つことがわかった。

【0040】配列番号：1

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

直接の起源

ライブラリー名：Nissimライブラリー

クローン名：11F12

配列：

Leu Thr Arg Asn Lys Phe Lys Ser Arg Gly His

5

10 11

【0041】配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

直接の起源

*ライブラリー名：Nissimライブラリー

クローン名：18B10

配列：

Thr Gln Tyr His His Val Arg Tyr Arg His Tyr Leu
 5 10 12

10 【0042】配列番号：3

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

直接の起源

ライブラリー名：Nissimライブラリー

クローン名：18C2

配列：

Ala Trp Asp Val Arg Thr Glu Arg
 5 8

【0043】配列番号：4

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

直接の起源

ライブラリー名：Nissimライブラリー

30 クローン名：6D5

配列：

Cys Trp Glu Asp Leu
 5

【0044】配列番号：5

配列の長さ：109

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

40 直接の起源

ライブラリー名：Nissimライブラリー

クローン名：11F12

*

配列：

CAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GCG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG CCC
 Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Pro

48

* クローン名：18B10

60

AAG	GGC	CGG	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC
AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT		240

(12)

特開平9-154583

21	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	22
	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
	65					70				
		75					80			
	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	GCC	GAG	
	GAC	ACG	ACC	GTG	TAT	TAC	TGT		288	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
	Asp	Thr	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys			
					85					
	90					95				
	GCA	AGA	ACG	CAG	TAT	CAT	CAT	GTG	AGG	
	TAT	CGT	CAT	TAT	TTG				330	
	Ala	Arg	Thr	Gln	Tyr	His	His	Val	Arg	
	Tyr	Arg	His	Tyr	Leu					
				100					105	
					110					

【0046】配列番号：7

配列の長さ：105

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：ペプチド

起源

直接の起源：Nissimライブラリー

※20 クローン名：18C2

配列：

GAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT CGG GGG	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
5 10 15	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
GCT ATG CAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG CAG TCG GTA	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
TCA GCT ATT GGT ACT GGT GGT GGC ACA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG	192
Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
50 55 60	
GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCC TTG TAT CTT	240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu	
65 70 75 80	
CAT ATG AAC ACC CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA	288
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
AGA CCT TGG CAT GTT CGT ACG TAG AGG	315
Arg Ala Trp Asp Val Arg Thr Glu Arg	
100 105	

【0047】配列番号：8

配列の長さ：102

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：ペプチド

起源

直接の起源：Nissimライブラリー

※ クローン名：6D5

配列：

CAG GTC CAG CTT GTG CAG TCT GCG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Arg Glu Val Lys Lys Pro Gly Arg	
5 10 15	

23 24

TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

GCT ATG CAT TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGA CTT GAG TGG ATG 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

GGA TGG ATC AAT GCT CGC AAT GGT AAC ACA GCA TAT GCA CAG AAG TTC 192
 Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

CAG GGC AGA GTC ACC ATA ACC AGG GAC ACG TCC ATG AGC ACA GCC TAC 240
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Met Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

ACG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT 288
 Thr Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

GCA AGA TGT ACG GAG GAT TTG 309
 Ala Arg Cys Arg Glu Asp Leu

100 103

【0048】配列番号：9

配列の長さ：51

配列の型：核酸

配列：

GCCTGAACCG CCTCCACCAG TCGACACGGT GACCAGGTA CCTTGGCCCC A 51

【0049】配列番号：10

配列の長さ：17

配列の型：核酸

配列：

CAGGTACCTT GGCCCCA 17

【0050】配列番号：11

配列の長さ：18

配列の型：核酸

配列：

GGCCACAGAC ACAGCAGG 18

【図面の簡単な説明】

【図1】 抗体を示す模式図である。

【図2】 抗体ペプチドのg3pを介するファージ表面での発現の状態を示す模式図であり、図中、(a)はFabフラグメント(抗体のV_H,C_HとV_H,C_H1からなるヘテロ二量体)、(b)はファージの模式図、(c)は一重鎖のFvフラグメント(V_Hの下流にリンカーを介してV_Hをつないだもの)の、g3pを介するファージ上での発現の状態を示している。

※鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

★鎖の数：一本鎖

30 トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

【図3】 プラスミドpHEN1-Vλ3の模式図。

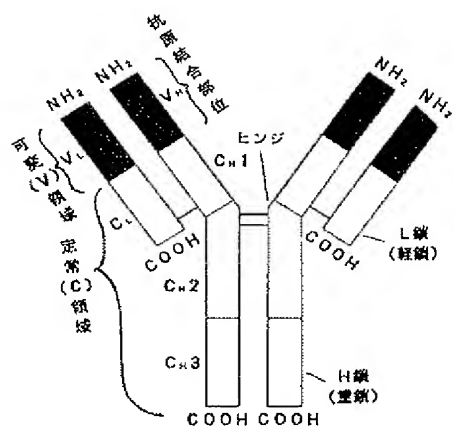
【図4】 クローン11F12を用いた競合阻害実験の結果を示すグラフ。

【図5】 クローン18B10を用いた競合阻害実験の結果を示すグラフ。

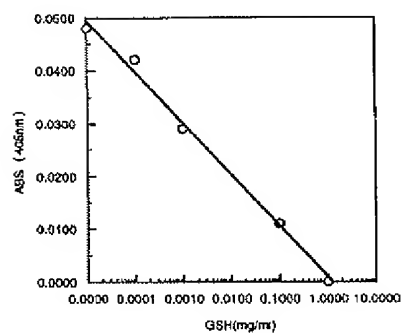
【図6】 クローン18C2を用いた競合阻害実験の結果を示すグラフ。

【図7】 クローン6D5を用いた競合阻害実験の結果を示すグラフ。

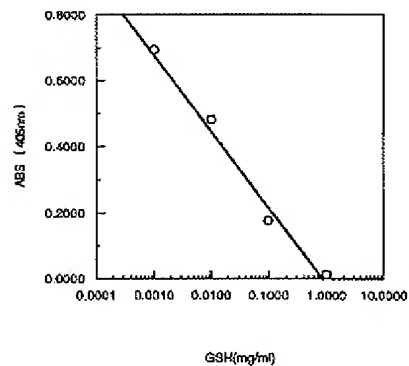
【図1】



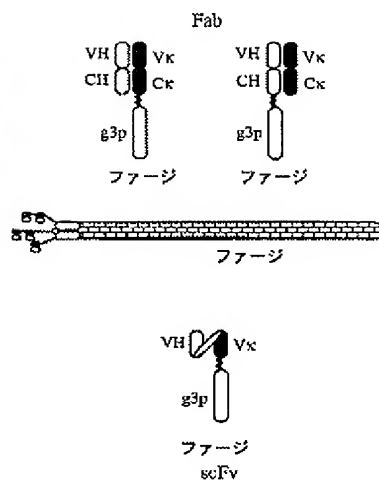
【図4】



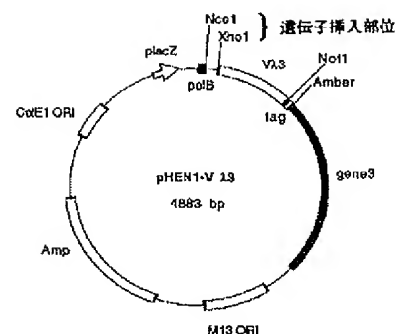
【図7】



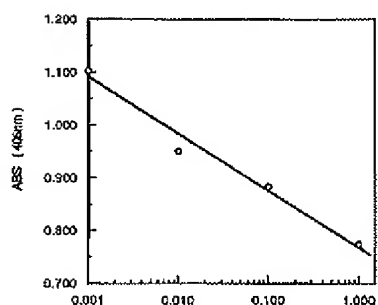
【図2】



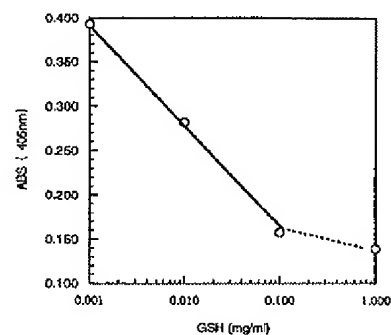
【図3】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁰
G 0 1 N 33/53
33/531

識別記号 庁内整理番号

F I
G 0 1 N 33/53
33/531

技術表示箇所
D
A

(15)

特開平9-154583

// A 6 1 K 39/395
(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)

A 6 1 K 39/395

D

